

19.5.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

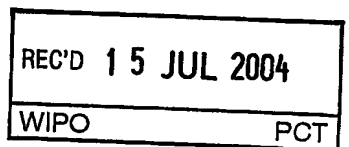
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 5月15日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-136876
[ST. 10/C]: [JP 2003-136876]

出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人 科学技術振興機構
水 雅美

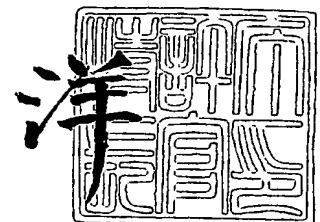


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 7月 1日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P0228T
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61P 37/04

【発明者】

【住所又は居所】 福岡県福岡市東区三苦 2 - 1 3 - 1 7

【氏名】 新海 征治

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府堺市中茶屋 7 4 - 1 0

【氏名】 水 雅美

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県姫路市西新町 1 1 7 - 7

【氏名】 櫻井 和朗

【発明者】

【住所又は居所】 福岡県北九州市八幡西区医生ヶ丘 8 - 1 1

【氏名】 甲元 一也

【発明者】

【住所又は居所】 福岡県福岡市東区松崎 3 - 1 3 - 7

【氏名】 沼田 宗典

【発明者】

【住所又は居所】 福岡県福岡市東区筥松 3 - 1 3 - 1 7 - 1 0 1

【氏名】 松本 貴博

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

【識別番号】 501100135

【氏名又は名称】 水 雅美

【代理人】

【識別番号】 100087675

【弁理士】

【氏名又は名称】 筒井 知

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067483

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 免疫刺激剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 免疫刺激性オリゴヌクレオチドと β -1,3-結合を有する多糖類との複合体から成る免疫刺激剤。

【請求項 2】 免疫刺激性オリゴヌクレオチドが、非メチル化 CpG モチーフを含むことを特徴とする請求項 1 の免疫刺激剤。

【請求項 3】 オリゴヌクレオチドのリン酸バックボーンが、ホスホロチオエートまたはホスホロジチオエート修飾されていることを特徴とする請求項 1 または 2 の免疫刺激剤。

【請求項 4】 β -1,3-結合を有する多糖類が、 β -1,3-グルカンまたは β -1,3-キシランであることを特徴とする請求項 1 の免疫刺激剤。

【請求項 5】 β -1,3-グルカンが、シゾフィラン、カードラン、レンチナン、パーキマン、グリホラン、ラミナランまたはスクレログルカンから選ばれたものであることを特徴とする請求項 4 の免疫刺激剤。

【請求項 6】 多糖類が、核酸結合性および／または細胞膜親和性官能基で修飾されていることを特徴とする請求項 1～5 のいずれかの免疫刺激剤。

【請求項 7】 核酸結合性および／または細胞膜親和性官能基が、カチオン性官能基、ステロイド性官能基、塩基性アミノ酸性官能基またはペプチド性官能基から選択されたものであることを特徴とする請求項 6 の免疫刺激剤。

【請求項 8】 オリゴヌクレオチドと多糖類との複合体が、水素結合と疎水性相互作用を介して形成される三重螺旋構造状のものであることを特徴とする請求項 1～7 のいずれかの免疫刺激剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、免疫刺激剤（Immunostimulant：免疫賦活剤、免疫促進剤などとも呼ばれる）の技術分野に属し、特に、免疫性オリゴヌクレオチドを、新規なトランスフェクション剤と複合体化することにより得られる、安全で、薬効の高い免

疫刺激剤を提供することに関する。

【0002】

【従来の技術】

免疫応答の刺激活性を有するオリゴヌクレオチド（免疫刺激（性）核酸、免疫刺激（性）オリゴヌクレオチド、免疫刺激（性）DNAなどと記述する）は、1984年にTokunagaらによりBCGの抗腫瘍性成分を検索する過程で発見された。そして、その活性化作用がシトシン・グアニン ジヌクレオチド（5'-CpG-3' : CpG配列）を含む特定の塩基配列に起因するものであることが明らかにされた。

【非特許文献1】 Tokunaga, T., et al., J. Natl. Cancer Inst., 72, 955 (1984)

【非特許文献2】 Tokunaga, T., et al., J. Natl. Cancer Res., 79, 682 (1988)

【0003】

脊椎動物または植物以外のCpG配列をもつゲノムDNAにも同様の活性が認められている。免疫刺激活性にはCpGコアの前後の配列も重要と考えられ、特に、非メチル化CpGを有し、その前後に置換プリン（Pu）と置換ピリミジン（Py）が配列した5'-PuPuCpGPyPy-3'が、代表的なCpGモチーフ（以下CpG DNAと略記することがある）としてコンセンサスを得ている。

【非特許文献3】 Krieg, A., et al., Nature, 374, 576 (1995)

【0004】

有用なCpG DNAヘキサマーの例を以下に記載する（ただし、A：アデニン、G：グアニン、C：シトシン、T：チミン、U：ウラシル）。

AACGTT、AGCGTT、GACGTT、GGCGTT、AACGTC、AGCGTC、GACGTC、GGCGTC、AACGCC、AGCGCC、GACGCC、GGCGCC、AACGCT、AGCGCT、GACGCT、およびGGCGCT

これらの配列を含む8～100個程度で構成されるオリゴヌクレオチドが免疫刺激活性を有するものである。

【特許文献1】 特表2001-503254

【0005】

以下の配列は、NK細胞の活性化に有効と報告されたCpG DNAの例である（下線

部分が³CpGモチーフ、大文字はチオール化DNA)。

accgataaccggtgccggtgacggcaccacg

accgataagcgctgccggtgacggcaccacg

accgatgacgtcgccggtgacggcaccacg

accgattcgcgagccggtgacggcaccacg

ggggggggggggcgatcggggggggggggg

ggggggggggggacgatcgtcgggggggggg

ggggggggggggaacgttgggggggggggg

GAGAACGCTCGACCTTCGAT

TCCATGACGTTCTGATGCT

TCTCCAGCGTGCGCCAT

GGggtcaacgttgaGGGGGg

【非特許文献 4】 伊保澄子, 山本三郎, Annual Review 免疫2001,137-146 (2002)

【0 0 0 6】

CpGモチーフ以外にも、免疫刺激性核酸として知られている幾つかの配列がある。例記すると、5' TTTT3' のようにチミジンに富むTリッチ核酸、5' GGGG3' のようにグアニジンに富むGリッチ核酸、チミジンとグアニジンの両方に富むT Gリッチ核酸、シチジンに富むCリッチ核酸などが非CpG免疫刺激性核酸として最近注目されている。

【特許文献 2】 特表平08-500738

【特許文献 3】 特表2002-512599

【特許文献 4】 特表2003-510282

【特許文献 5】 特表2003-510290

【0 0 0 7】

これらの免疫刺激性核酸の免疫系細胞に対する効果の大きな特徴は、抗原提示細胞を活性化することである。マウスやヒトの単球、マクロファージ、樹状細胞などに直接作用して、IL-6、TNF- α 、IL-12、IFN α/β 、IL-18、一酸化窒素などの免疫力増強作用をもつサイトカインを産生させる。

【0008】

免疫性疾患に対する治療用の核酸ならびにDNAワクチンの組成物に関する特許出願が、最近、増えており、例えば、ザ ユニバーシティ オブ アイオワ リサーチ ファウンデーションの出願によるものは、ウイルス、細菌、真菌または寄生体の感染によって引き起こされる免疫系不全や、ガンにかかっているヒトや動物の処置、リポ多糖やエンドトキシンの暴露から生ずる気流の急性減少を起こした被験体のための治療的使用などのため、またはアジュバント用に多数のCpGモチーフ系の配列を提案している。

【特許文献6】 特表平10-506265

【特許文献7】 特表2001-503267

【特許文献8】 特表2001-513776

【0009】

CpGモチーフをDNAワクチンに使用する特許の出願で、魚介類に対するものも認められる。

【特許文献9】 特開平9-285291、

同様に、動物のパルボウイルスの感染予防の目的のためのものもある。

【特許文献10】 特表2000-509976、

また、特許文献1、11および12などにも、免疫刺激活性を有する類似の配列が多数記載されている。

【特許文献11】 特表2002-517156

【特許文献12】 特表2002-526425

【0010】

アンチセンスDNAを用いる遺伝子治療の場合と同様に、免疫刺激性オリゴヌクレオチドのリン酸バックボーンは、ヌクレアーゼ耐性化のために、ホスホジエステル結合の部分がホスホロチオエート結合に修飾されている例が多い。また、免疫刺激オリゴヌクレオチドの細胞との親和性を高める目的でリポソーム、カチオン脂質、コレステロールなどのトランスフェクション剤を併用する例も多く見られる。

【0011】

遺伝子治療の際のアンチセンスDNAのトランスフェクション剤としては、当初、レトロウイルスまたはアデノウイルスがin vitroで極めて見込みのある結果を与えたが、これら天然由来のウイルスの炎症性、免疫原的性質、ならびに突然変異誘発および細胞ゲノム中への組み込みの危険性が原因して、これらのin vivoにおける使用は制限されている。

【非特許文献 5】 Mulligan, Science, 260, 926-932 (1993)

【非特許文献 6】 Miller, Nature, 357, 455-460 (1992)

【非特許文献 7】 Crystal, Science, 270, 404-410 (1995)

【0012】

天然由来の遺伝子のトランスフェクション剤の代替物として、ウイルス系よりも取り扱いが簡単であるのみならず、細胞へDNAを確実に効率良く集中させることが可能な人工材料の非ウイルス系キャリアーの使用が提示された。

【非特許文献 8】 Tomlinson and Rolland, J. Contr. Rel., 39, 357-372 (1996)

【0013】

現在、非ウイルス性の人工キャリアーとしてよく検討されているのはポリエチレンイミン (PEI) である。多数の異なった付着細胞および浮遊細胞ライン中では、3 次元的分岐構造のカチオンポリマーであるPEIは、ある場合には平均以上のトランスフェクション率を引き起こす結果になった。

【非特許文献 9】 Boussif et al., Gene Therapy, 3, 1074-1080 (1996)

【0014】

また、PEIと同様、窒素の置換基で修飾された、種々のカチオン性ポリマー、カチオン性脂質などが遺伝子キャリアー、トランスフェクション剤、薬物担体などという名称で、最近、多数の特許が出願されるようになってきた。

【0015】

しかしながら、PEIのようなカチオン性ポリマーの安全性についてはほとんど確認されていないのが現状である。カチオン性を付与するには、通常、アミノ基の存在が不可欠であるが、アミノ基を有する物質は生理活性が高く、体内毒性等の危険性が考えられる。事実、今まで検討されたいかなるカチオン性ポリマーも

未だ実用に供されておらず、医薬品添加物辞典等に記載されていない。

【非特許文献10】 医薬品添加物辞典

【非特許文献11】 日本医薬品添加剤協会編集、薬事日報社

【0016】

しかるに、筋肉内注射製剤の臨床薬として実際に使用されている多糖類に、 β -1,3-グルカンが存在する。この多糖は天然では三重螺旋構造をとっていることが古くから知られている。

【非特許文献12】 Theresa M. McIntire and David A. Brant, J. Am. Chem. Soc., 120, 6909 (1998)

【0017】

さらに、この多糖は、既に生体内での安全性が確認されており、婦人科癌に対する免疫増強法の筋肉内注射薬として20年以上の使用実績がある。

【非特許文献13】 清水, 陳, 荷見, 増淵, Biotherapy, 4, 1390 (1990)

【非特許文献14】 長谷川, Oncology and Chemotherapy, 8, 225 (1992

)

【0018】

このような β -1,3-グルカンを、DNA等の生体材料とコンジュゲートし、遺伝子キャリアーに使用できることが知られている。この先行技術には、天然の β -1,3-グルカン、すなわち、三重螺旋構造を有する β -1,3-グルカンをそのまま使用し、これと生化学活性のある材料を、共有結合を介して、 β -1,3-グルカン/生体材料のコンジュゲートを製造する方法が述べられている。

【特許文献13】 PCT/US95/14800

【0019】

また、最近、本発明者らにより、 β -1,3-結合を主鎖とする多糖類が、人工的に処理されることで、各種の核酸と新しいタイプの複合体を形成することが見出された。

【特許文献14】 PCT/JP00/07875

【特許文献15】 PCT/JP02/02228

【非特許文献 15】 櫻井, 新海, J. Am. Chem. Soc., 122, 4520 (2000)

【非特許文献 16】 木村, 甲元, 櫻井, 新海, Chem. Lett., 1242 (2000)

)

【0020】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、免疫刺激性オリゴヌクレオチドを、安全でトランスフェクション効果の高い新タイプのキャリアーと複合体化し、免疫刺激剤として提供することにある。

【0021】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、 β -1,3-結合を保有する多糖類をキャリアーとして用いることにより、免疫刺激性オリゴヌクレオチドの作用を高め、免疫力増強に優れた安全な免疫刺激剤が得られることを見出した。

かくして、本発明に従えば、免疫刺激性オリゴヌクレオチドと β -1,3-結合を有する多糖類との複合体から成る免疫刺激剤が提供される。

【0022】

【発明を実施するための最良の形態】

本発明では、免疫刺激性オリゴヌクレオチド、すなわち、免疫応答を刺激し免疫力の増強に活性を有するオリゴヌクレオチドを主たる薬剤として使用する。本発明において対象となる免疫刺激性オリゴヌクレオチドとしては、前記文献に記載されているような、各種の非メチル化CpGモチーフを含むものが好ましく使用される。また、同様に例示した、非CpG免疫刺激性オリゴヌクレオチドも使用することができる。非CpG免疫刺激オリゴヌクレオチドは、単独またはCpGモチーフと組み合わせて使用される。投与されるこれらのオリゴヌクレオチドはマクロファージなどの免疫細胞に作用し、サイトカインの産出等を介して免疫力を高める効果がある。

【0023】

本発明で使用するオリゴヌクレオチドのリン酸バックボーンは、ヌクレアーゼ耐性を増すために、主鎖のホスホジエステル結合の部分をホスホロチオエートま

たはホスホロジチオエート修飾したものが、通常、用いられるが、ホスホジエステル結合が一部または全部保持されたものでも差し支えない。

【0024】

オリゴヌクレオチドと複合体を形成させるトランスフェクション剤として、本発明では、 β -1,3-結合を有する多糖類である β -1,3-グルカンもしくは β -1,3-キシランが用いられる。中でも、シゾフィラン、カードラン、レンチナン、パーキマン、グリホラン、ラミナランまたはスクレログルカンから選ばれた β -1,3-グルカンが好適である。

【0025】

本発明で用いられる上記のごとき多糖類は、天然のままでも使用可能であるが、核酸結合性および／または細胞膜親和性官能基で修飾されたものがトランスフェクション能の点でより適当である。ここで、核酸結合性とは、核酸と相互作用して多糖類と当該核酸との結合を向上させる性質を指称する。また、細胞膜親和性とは、細胞膜タンパク質や細胞膜脂質（リン脂質）と親和性のあることを指称する。本発明においては、このような核酸結合性および細胞膜親和性のいずれか一方または両方の性質を発揮するような官能基で修飾した多糖類を用いることが好ましい。本発明で使用されるのに特に好適な核酸結合性および／または細胞膜親和性官能基の例として、カチオン性官能基、ステロイド性官能基、塩基性アミノ酸性官能基およびペプチド性官能基を挙げることができる。

【0026】

カチオン性官能基とは正電荷を有する官能基であり（その具体例については後述の実施例2参照）、多糖類の分枝に付与されたカチオン性官能基は、DNAやRNAのような核酸の持つ負電荷と静電的相互作用により多糖と核酸との結合を高める。ステロイド性官能基（具体例については実施例4参照）および塩基性アミノ酸性官能基（具体例については実施例3参照）は、ステロイド骨格にスパーサーを介して結合しているアミノ基およびアミノ酸のアミノ基の正電荷に因る核酸結合性と、ステロイド骨格および塩基性アミノ酸残基のもつ細胞膜親和性との効果が期待されるものである。ペプチド性官能基（例えば、後述の実施例5～7に示すRGD）は、主として細胞膜親和性による効果で核酸のトランスフェクション能を

促進するものと考えられる。多糖類を修飾して、以上のような核酸結合性および／または細胞膜親和性官能基を付与する方法としては、通常の有機化学の手法であればよいが、一般的には、多糖の1,6-グルコピラノシド分枝を過ヨウ素酸酸化した後、還元的アミノ化を行うことにより該当する官能基を結合させる（図1参照）。これらの事項については、本発明者らによるPCT/JP02/02228（特許文献15）にも詳述されている。

【0027】

本発明に従い免疫性刺激オリゴヌクレオチドと多糖類との複合体を調製するには、本発明者らによるPCT/JP02/02228（特許文献15）に詳細に記述されている方法に従うのが特に好ましい。すなわち、本来は、天然もしくは水中で三重螺旋として存在する β -1,3-グルカン等の多糖を、極性溶媒（例えば、ジメチルスルホキシド）に溶解して1本鎖に解いた後、1本鎖の核酸を加え、溶媒を水に戻すこと（再生過程）によって、核酸1本、多糖2本から成る、三重螺旋状の複合体として使用する（後述の実施例1参照）。この複合体は、ヌクレオチド1本鎖と多糖2本鎖が水素結合と疎水性相互作用を介して三重螺旋状にコンジュゲートした、非共有結合性のものと考えられる。複合体は、通常、水溶液として得られるので、限外ろ過法などの比較的簡単な方法で必要な純度に精製された後、治療用に使われる。

【0028】

【実施例】

以下、具体的な免疫刺激剤としての調製法、得られた免疫刺激剤のキャラクターゼーションおよびin vitro試験における投与の方法と評価に関して本発明の特徴を実施例において詳細に示すが、これらの実施例は本発明を制限するためのものではない。

実施例1

β -1,3-グルカン（シゾフィラン）およびCpGモチーフを含むオリゴヌクレオチド（CpG DNA）を複合体化した免疫刺激剤の調製 三重螺旋構造のシゾフィランを文献記載の定法に従って製造した。すなわち、ATCC（American Type Culture Collection）から入手したSchizophyllum commune. Fries（ATCC 44200）を、

最小培地を用いて7日間静置培養した後、細胞成分および不溶残渣を遠心分離して得られた上清を超音波処理して分子量45万の三重螺旋シゾフィランを得た。このシゾフィランをジメチルスルホキシド（以下、DMSOと表記）に溶解させて1本鎖にし、濃度を30mg/mlに調整し、この溶液1 μ l、3 μ lの純水、10mMのトリス緩衝液（pH7.8）1 μ lと、3 mg/mlのCpG DNA溶液5 μ lを混合した。得られた溶液はすべて透明で、均一であった。

【非特許文献17】 Gregory G. Martin, et al., Am. Chem. Soc. Polymer Prepr. 38 (1), 253-254 (1997)

【非特許文献18】 K. Tabata, et al., Carbohydr. Res., 89, 121-135 (1981)

【0029】

使用したCpGモチーフを含むオリゴヌクレオチド（固相合成品）は、塩基配列内に一箇所、シトシン・グアニン ジヌクレオチド（CpG）の配列を含みホスホロチオエート結合をもつTCC ATG ACG TTC CTG ATG CTの3'末端に40のdAをつけたシーケンス（配列番号1）をCpG DNAとした。

【非特許文献19】 Y. Aramaki, et al. Biol. Pharm. Bull., 25(3) 351-355 (2002)

【0030】

実施例2

カチオン性誘導体の合成（アミノ基修飾シゾフィラン）およびキャラクタリゼーション 図1のスキームに従い、カチオン性誘導体を合成した。アミノ基の導入率の制御は過ヨウ素酸酸化に使用する過ヨウ素酸ナトリウムの当量数により制御することが可能である。従って、あらゆる導入率に対して合成法には相違は生じない。ここでは、シゾフィランへ4.6、17、20および36%のアミノ基を導入したカチオン修飾シゾフィランの合成例を示す。また、導入するアミノ基として2-アミノエタノールおよびスベルミンを使用した。アミノ基の導入率は側鎖グルコースに対する過ヨウ素酸ナトリウムの当量数によって制御することが可能であり、その実験結果は実施例3に示した。実施例1に記された方法にて分子量45万のシゾフィランを得た。このシゾフィラン100 mgを水100 mlに溶解させた。そこへ過

ヨウ素酸ナトリウム水溶液（シゾフィラン側鎖グルコースに対して10%および40%、80%の当量数若しくは、過剰量である500%）をゆっくりと加え、4℃で2日間攪拌した。反応溶液を透析膜（排除限界12000）で透析後、凍結乾燥した。得られた白色個体をジメチルスルホキシド20 mlに溶解させ、2-アミノエタノールおよびスペルミン、2ml（大過剰、10000当量以上）を加え、室温で2日間攪拌を続けた。過剰の水素化ヨウ素酸ナトリウムを酢酸で失活させた後、反応溶液を透析膜（排除限界12000）で透析（酸性水溶液、塩基性水溶液、蒸留水）し、凍結乾燥することでカチオン性誘導体を調製した。

【0031】

アミノ基の導入率の決定については元素分析による窒素の微量分析（検出下限0.05%）により行った。窒素の微量分析実験は全て3回の測定を行った結果を表1に示した。また、分子量についてはゲルパーミエーションクロマトグラフィー（GPC）および粘度測定から検討し、原料と一致した分子量を示すことを明らかにした。

【0032】

【表1】

過ヨウ素酸の当量数 (%)	10	40	80	500
アミノ基の導入率 (%)	4.6 - 4.7	16.3 - 17.8	19.3 - 20.8	35.2 - 37.4

【0033】

実施例3

アミノ酸誘導体の合成（アルギニン修飾シゾフィラン）およびキャラクタリゼーション 図1のスキームに従い、アミノ酸誘導体を合成した。アミノ酸の導入率の制御は実施例2と同様の方法で制御した。ここでは、シゾフィランへ4.6、17、20、および36%のアルギニンを導入したアルギニン修飾シゾフィランの合成例を示す。

【0034】

実施例1に記された方法にて分子量45万のシゾフィランを得た。このシゾフィラン100mgを水100mlに溶解させた。そこへ過ヨウ素酸ナトリウム水溶液（シゾフ

イラン側鎖グルコースに対して10、40および70%の当量数)をゆっくりと加え、4℃で2日間攪拌した。反応溶液を透析膜(排除限界12000)で透析後、凍結乾燥した。得られた白色個体をDMSO 20mlに溶解させ、アルギニンメチルエステル2ml(大過剰、10000当量以上)を加え、室温で2日間攪拌を続けた。過剰の水素化ホウ素ナトリウムを酢酸で失活させた後、反応溶液を透析膜(排除限界12000)で透析(酸性水溶液、塩基性水溶液、蒸留水)し、凍結乾燥することでアルギニン修飾シゾフィランを調製した。

【0035】

アルギニンの導入率の決定は、元素分析による窒素の微量分析(検出下限0.05%)により行った。測定は全て3回ずつ行った。結果を表2に示した。

【0036】

【表2】

過ヨウ素酸の当量数	アルギニンの導入率
10 %	3.6 %
40 %	9.3 %
70 %	13.5 %

【0037】

実施例 4

コレステロール誘導体(コレステロール修飾シゾフィラン)の合成およびキャラクタリゼーション 図1のスキームに従い、コレステロール誘導体を合成した。コレステロールの導入率の制御は実施例2と同様の方法で制御した。ここでは、側鎖に対して4.5%のコレステロールを修飾したコレステロール修飾シゾフィランの合成法を示す。即ち、実施例1で調製したシゾフィラン100mgを水100mlに溶解させ、過ヨウ素酸ナトリウム1.65mg(側鎖グルコースに対して5mol%)を加え、遮光下、4℃で2日間攪拌した。反応溶液を透析膜(排除限界12000)で透析し、凍結乾燥した。

【0038】

得られた白色固体をDMSOに懸濁させ、アミノ基末端を有するステロイド誘導体(ここでは、Ishii らの文献に従って合成した3β-コレスト-5-エン-3-

イルN-(2-アミノエチル)カルバメート)を加え、室温で2日撹拌を続けた。反応溶液に水素化ホウ素ナトリウム100mgを4時間間隔で2度加え、その後、室温で1日撹拌した。過剰の水素化ホウ素ナトリウムを酢酸で失活させ、反応溶液を透析膜(排除限界12000)で透析し、凍結乾燥することでコレステロール修飾シゾフィランを得た。

【非特許文献20】 Tsutomu Ishii, Ritsuko Iguchi, Erwin Snip, Masato Ikeda and Seiji Shinkai, *Langmuir*, **17**, 5825-5833 (2001)

【0039】

コレステロールの導入率の決定は、元素分析による窒素の微量分析(検出下限0.05%)により行った。測定は全て3回ずつ行った。結果を表3に示した。

【0040】

【表3】

過ヨウ素酸化率	窒素含有率	コレステロールの導入率
5.0 %	0.358~0.383	4.5 %

【0041】

実施例5

結合性官能基を含むペプチドの合成 ペプチド鎖によるシゾフィランの化学修飾において、ペプチド鎖にはシゾフィランへの結合性官能基を有していることが必要である。結合性官能基およびスペーサーには特に制約はないが、ここでは、例としてマイケル付加反応によりマレインイミド基へ共有結合として固定化できるチオールを有するシステインを含むペプチド鎖の合成を以下に示す。

【0042】

ペプチドの配列としては、細胞膜に対する親和性が高いことが知られているアルギニンオリゴマー(ここでは8量体を合成し、そのペプチド鎖をR8と表記する:配列番号2)、および、細胞接着因子が認識することで知られているアルギニン-グリシン-アスパラギン酸の配列(RGDと表記する:配列番号3)を含み、N末端にシステインを導入しているペプチド(図2参照)をそれぞれ合成した。ペプチド鎖はFmoc法に従って合成し、精製はHPLC(高速液体クロマトグラフィー

）にて行った（精製条件：日立L-7100、ODSカラム（YMC社製）、溶離液はアセトニトリル/蒸留水（共に0.1vol%のトリフルオロ酢酸を含む）= 5/95を40分かけて20/80にグラジエントした）。同定はMALDI-TOF MS（マトリックス支援イオン化-飛行時間型質量分析計）にて行い、同定結果は表4に示す（マトリックス：C HCA）。

【非特許文献21】 Fmoc法；「固相合成ハンドブック」、メルク株式会社
【0043】

【表4】

ペプチド	理論値	実測値
R8	1371.65	1371.20
RGD	450.48	450.40

【0044】

実施例6

ペプチド修飾シゾフィランの合成 実施例5にて合成した、ペプチド鎖をシゾフィランへ導入するために図3に示す合成スキームに従って合成した。反応は、過ヨウ素酸酸化、還元的アミノ化、スペーサーの導入、ペプチドの導入反応の4段階からなる。ペプチドの導入率は過ヨウ素酸酸化反応により制御することが可能である。2、4段階目では反応の進行を元素分析により評価した。結果は実施例7に示す。

【0045】

実施例1で調製したシゾフィラン300mgを水300mlに溶解させ、過ヨウ素酸ナトリウム水溶液（9.87mg：シゾフィランの側鎖に対して0.1当量（10%））を加え、遮光下4℃で2日間攪拌した。反応溶液を透析膜（排除限界12000）で透析後、凍結乾燥し、白色固体1を得た。

【0046】

得られた白色固体1 100mgを極性有機溶媒のDMSO 10ml、28%アンモニア水溶液10mlに溶解させ、シアノ水素化ホウ素ナトリウム200mg（大過剰）を加え、室温で4日間攪拌した。反応溶液を透析膜（排除限界12000）で透析後、凍結乾燥し、白色固体2を得た。

【0047】

得られた白色固体2をDMSO 10mlに溶解させ、3-マレインイミドプロピオン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル100mg（大過剰）を加え、窒素気流下、室温で24時間攪拌した。反応溶液を透析膜（排除限界12000）で透析後、凍結乾燥し、白色固体3を得た。

【0048】

得られた白色固体3をDMSO 5mlに溶解させた。また、実施例1にて得られたシステインを含むペプチド鎖（約50mg）を蒸留水に溶解させ、先のDMSO溶液と混合し、その溶液を室温で2日間攪拌した。反応溶液を透析膜（排除限界12000）で透析後、凍結乾燥し、ペプチド修飾シゾフィランを得た。

【0049】

実施例7

ペプチド修飾シゾフィランのキャラクタリゼーション 実施例6にて得られた、ペプチド修飾シゾフィランのキャラクタリゼーション（各反応後の導入率の窒素元素分析による評価、分子量）を行った。表5には実施例6の各素反応における窒素の元素分析を元にした官能基の導入率（ペプチド修飾率）の変化を示している。また、分子量はゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）により評価したところ、ペプチドの修飾前後において分子量の大きな変化は起こらないことを確認している。

【0050】

【表5】

側鎖の酸化率	R8 修飾シゾフィラン		RGD 修飾シゾフィラン	
	5 %	10 %	5 %	10 %
白色固体2	3.7 ± 0.1 %	9.4 ± 0.1 %	3.7 ± 0.1 %	9.4 ± 0.1 %
白色固体3	3.7 ± 0.3 %	2.3 ± 0.3 %	3.7 ± 0.3 %	2.3 ± 0.3 %
ペプチド修飾シゾフィラン	0.3 ± 0.1 %	0.5 ± 0.1 %	1.0 ± 0.1 %	1.3 ± 0.3 %

【0051】

実施例8

カチオン化シゾフィランおよびアミノ酸修飾シゾフィラン、コレステロール修飾

シゾフィランならびにペプチド修飾シゾフィランとCpG DNAとの複合体化免疫刺激剤の調製 17、20および36 %のアミノ基修飾シゾフィラン（以下、N-SPGと表記）、4.6 %のスペルミン修飾シゾフィラン（以下、SP-SPGと表記）、3.6、9.3および13.5%のアルギニン修飾シゾフィラン（以下、Arg-SPGと表記）、4.5%のコレステロール修飾シゾフィラン（以下、Chol-SPGと表記）、0.3および0.5%のR8修飾シゾフィラン（以下、R8-SPGと表記）、ならびに1.0および1.3 %のRGD修飾シゾフィラン（以下、RGD-SPGと表記）をそれぞれDMSOに溶解させて1本鎖にし、濃度を30mg/mlに調整し、この溶液1 μ l、純水3 μ l、10mMのトリス緩衝液（pH7.8）1 μ lと、実施例1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド溶液（3mg/ml）5 μ lを混合した。得られた溶液はすべて透明で、均一であった。

【0052】

以後、実施例2、3、4、および6にて合成したシゾフィラン類を総称して化学修飾シゾフィランと表記し、各化学修飾シゾフィランはR8(0.3)-SPGというようにかっこ内にその導入率を示す表記であらわす。

【0053】

実施例9

CpG DNAとシゾフィラン類との複合体形成のゲル電気泳動法による確認 CpG DNAは負に帯電したリン酸基が正電荷方向に電気泳動する。さらにゲルマトリックスの網目の隙間を泳動するためCpG DNAがシゾフィランと複合体を形成することにより分子量が大きくなるほど移動度は減少する。そこで、CpG DNAにシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランを添加して実施例1および8に記載の方法で複合体を形成させた後、MOPS緩衝液（20mM MOPS（pH 7.0）、5mM 酢酸ナトリウム、1mM EDTA、3%ジメチルスルホキシド）中で2%アガロースゲル用いて2V/cmで1時間電気泳動させ、Gel Star Nucleic Acids Stain（BMA）で染色後、トランスイルミネーター下でその移動度を評価した。

【0054】

図4に例示したアガロースゲル電気泳動の結果によると、シゾフィランおよび化学修飾シゾフィランの添加に伴って、CpG DNAの移動度は減少しており、複合体の形成が確認された。

【0055】

実施例10

シゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させたCpG DNAの刺激によるマウス由来腹腔マクロファージからのサイトカインIL-12産生量の増強効果

マウス由来腹腔マクロファージの単離は、文献記載の定法で行った。すなわち8週齢の雌のBalb/cマウスの頸動脈を切断し脱血死させ、70%エタノールで消毒後に腹部外皮に切れ目を入れ外皮をはいで腹膜を露出させた。冷PBS（リン酸緩衝化生理食塩水）を5ml腹部に注入し、よくマッサージしたのち液を回収した。ポリプロピレン製の遠心管を用いて1,000 rpm、10分間、4℃で遠心した。上清を除き10%仔牛胎児血清を含むRPMI1640培地に懸濁した。

【非特許文献22】 日本生化学会編、新生化学実験講座12 分子免疫学I 免疫細胞・サイトカイン、東京化学同人（1989）

【0056】

96穴プレートに100 μ lの10%仔牛胎児血清を含むRPMI1640培地に懸濁した2 \times 10⁵個のマウス由来腹腔マクロファージを播種し37℃、5%CO₂下で2時間培養してプレートに細胞を接着後に、CpG DNAおよび実施例1と実施例8で調製したCpG DNAとシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランとの複合体を限外ろ過膜（排除限界3000）でろ過してDMSOを除去し濃度を再調整したものを添加し、37℃、5%CO₂下で24時間培養後に培養上清を回収した。

【0057】

培養上清中に含まれるマウスの全IL-12量の測定は、Mouse Interleukin-12 Total ELISA（ENDOGEN社製）を利用し、付属のプロトコールに従って測定した。その測定結果を図5に示した。図5に示したように、培養上清に含まれる全IL-12量は、CpG DNA単独投与よりもCpG DNAとシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランの複合体である本発明の免疫刺激剤の方が、多く含まれていた。この結果、本発明の免疫刺激剤投与により、マクロファージが産生するサイトカイン（IL-12）量の増加が確認された。

【0058】

比較例1

シゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させたnon-CpG DNA (CpGモチーフを含まないオリゴヌクレオチド) によるマウス由来腹腔マクロファージからのサイトカインIL-12産生効果 実施例10で用いたCpG DNAの代わりに塩基配列内に、シトシン・グアニン ジヌクレオチド (CpG) の配列を含まない (免疫刺激効果を示さない) ホスホロチオエート結合をもつCCCCCCCCCの3'末端に40のdAをつけたシークエンスのオリゴヌクレオチド (以下、non-CpG DNAと表記: 配列番号4) を用いて、実施例10と同様の方法でマウス由来腹腔マクロファージからのサイトカインIL-12産生量を評価した。この結果を図6に例示した。

【非特許文献23】 Y. Aramaki, et al. Biol. Pharm. Bull., 25(3) 351-355(2002)

【0059】

図6に示すように、non-CpG DNA単独投与およびシゾフィランまたは化学修飾シゾフィランとの複合体投与において、培養上清中のマウスの全IL-12量は増加しておらず、培地のみと比較してIL-12産生量にはほぼ同じ程度であった。この結果、免疫刺激効果のないオリゴヌクレオチド (この例では、non-CpG DNA) との複合体形成物は、免疫刺激効果が無い (サイトカインのIL-12が産生されない) ことが示された。

【0060】

実施例11

シゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させたCpG DNAの刺激によるマウス由来マクロファージ様細胞J774.A1からのサイトカインIL-12産生量の増強効果 実施例10で用いたマウス由来腹腔マクロファージの代わりに、免疫刺激物質によってIL-12産生が増強されることが報告されているマウス由来マクロファージ様細胞J774.A1 (ATCCより入手) を用いて、実施例10と同様の方法でマウス由来腹腔マクロファージからのサイトカインIL-12産生量を評価した。この結果を図7に例示した。

【非特許文献24】 E. R. Kandimalla, et al., Bioconjugate Chem., 13(5), 966-974(2002)

【0061】

図7に例示したように、培養上清に含まれる全IL-12量は、CpG DNA単独投与よりもCpG DNAとシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランの複合体である本発明の免疫刺激剤の方が、多く含まれていた。この結果、実施例10に例示したマウス由来腹腔マクロファージと同様に、本発明の免疫刺激剤投与により、マウス由来マクロファージ様細胞J774.A1からのサイトカイン (IL-12) 産生量の増加が確認された。

【0062】

【発明の効果】

本発明は、安全性の確認された β -1,3-グルカン等の多糖類をキャリアーとして用いる安全で優れた免疫増強作用を有し、免疫治療および遺伝子治療等の分野で利用される新しいタイプの免疫刺激剤である。

【0063】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<110> MIZU Masami

<120> Immunostimulant

<160> 4

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial S-oligo nucleotide

<220>

<223> solid phase synthesized nucleotide

<400> 1

tcctgatgct tcctgatgct aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> solid phase synthesized peptide

<400> 2

Arg Gly Asp

1

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> solid phase synthesized peptide

<400> 3

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1

5

<210> 4

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial S-oligo nucleotide

<220>

<223> solid phase synthesized nucleotide

<400> 4

cccccccca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明に従う、 β -1,3-グルカン（シゾフィラン）のアミノ基修飾シゾフィラン、アミノ酸修飾シゾフィランおよびコレステロール修飾シゾフィランの合成スキームの例を示す。

【図 2】

ペプチドR8およびRGDのアミノ酸配列を示す。

【図 3】

ペプチド修飾シゾフィラン（R8-SPGおよびRGD-SPG）の合成スキーム例を示す。

【図 4】

本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィラン、アミノ基修飾シゾフィラン、アルギニン修飾シゾフィラン、コレステロール修飾シゾフィラン、R8修飾シゾフィラン、およびRGD修飾シゾフィランとCpG DNAとの複合体化を示すアガロースゲル電気泳動パターンを示している。

【図 5】

本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させたCpG DNAの刺激によるマウス由来腹腔内マクロファージからのサイトカインIL-12産生量の増強効果の結果を示す。

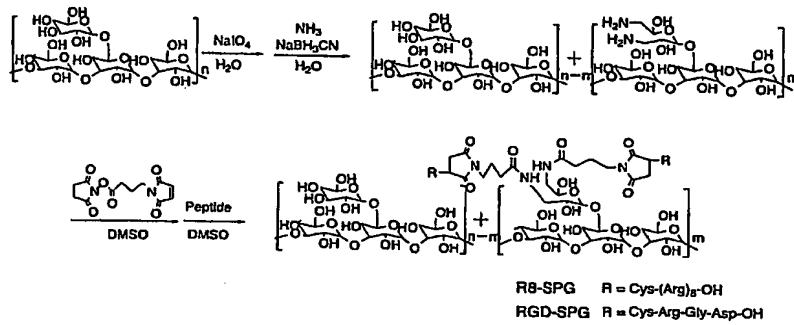
【図 6】

本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させたnon-CpG DNA (CpGモチーフを含まないオリゴヌクレオチド) によるマウス由来腹腔内マクロファージからのサイトカインIL-12産生効果の結果を示す。

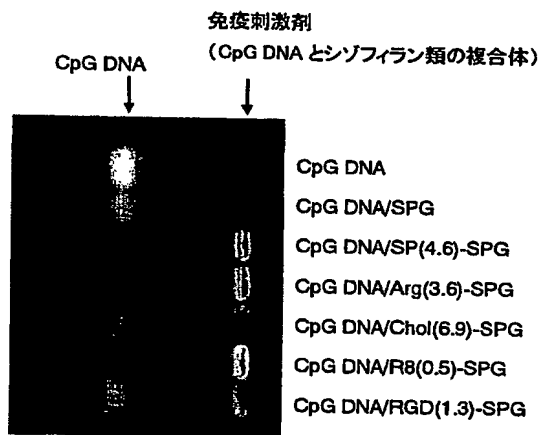
【図 7】

本発明に従う免疫刺激剤のシゾフィランおよび化学修飾シゾフィランと複合体を形成させたCpG DNAの刺激によるマウス由来マクロファージ様細胞J774.A1からのサイトカインIL-12産生量の増強効果の結果を示す。

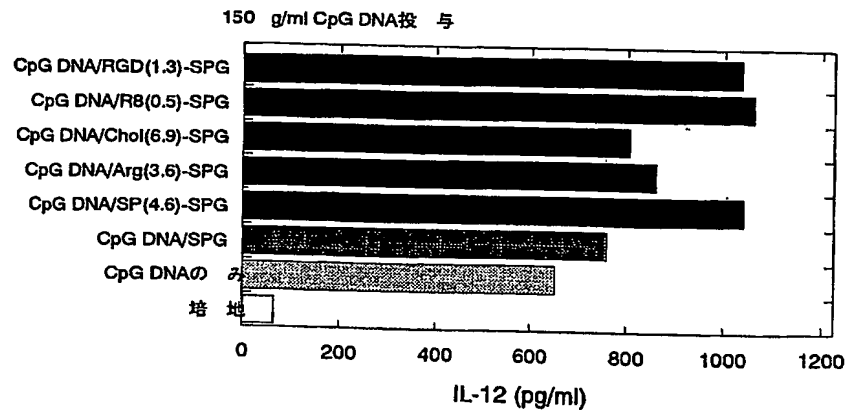
【図 3】



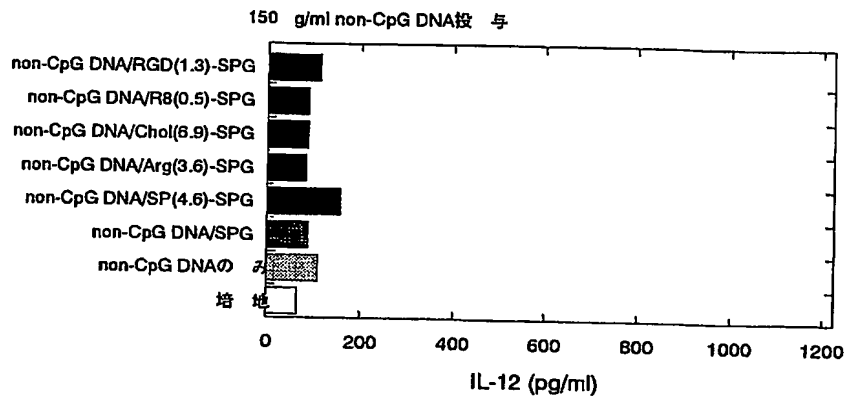
【図 4】



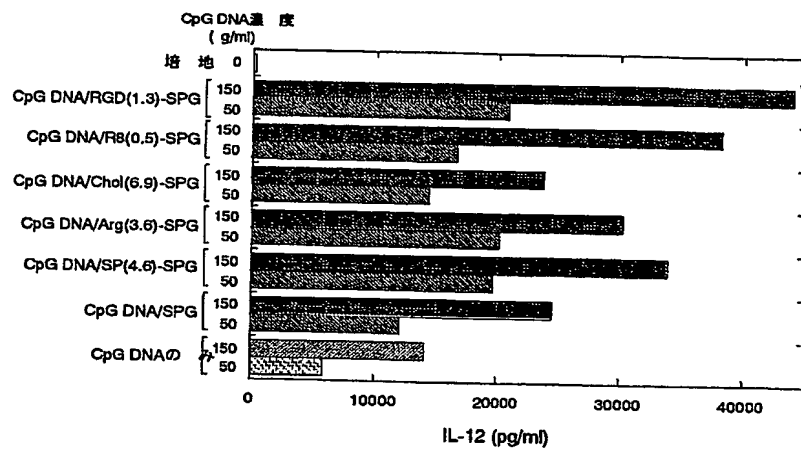
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 免疫刺激性オリゴヌクレオチドを、安全でトランスフェクション効果の高い新しいタイプのキャリアーと複合体化し、免疫刺激剤として提供する。

【解決手段】 免疫刺激性オリゴヌクレオチドを β -1,3-結合をもつ多糖類（好ましくは、シゾフィランのような β -1,3-グルカン）と複合体化し、免疫刺激剤として投与する。免疫刺激性オリゴヌクレオチドの好ましい例は非メチル化 CpG モチーフを含むものである。多糖類は核酸結合性および／または細胞親和性官能基で修飾したものを使用するのが好ましい。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-136876
受付番号	50300807438
書類名	特許願
担当官	第四担当上席 0093
作成日	平成15年 5月16日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 5月15日
-------	-------------

次頁無

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)
【提出日】 平成15年10月31日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2003-136876
【承継人】
 【識別番号】 503360115
 【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
 【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
 【代表者】 沖村 憲樹
 【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417

【提出物件の目録】
 【物件名】 権利の承継を証明する書面 1
 【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

 【物件名】 登記簿謄本 1
 【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2003-136876

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

特願 2003-136876

出願人履歴情報

識別番号

[501100135]

1. 変更年月日

2001年 3月13日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府堺市中茶屋74-10

氏 名

水 雅美

特願 2003-136876

ページ： 3/E

出願人履歴情報

識別番号

[503360115]

1. 変更年月日

2003年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構